

Title	RNA aptamerを用いた基本転写機構の解析
Author(s)	平芳, 一法
Citation	(2002)
Issue Date	2002-03
URL	http://hdl.handle.net/2433/84933
Right	学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。
Type	Research Paper
Textversion	publisher

RNA aptamer を用いた基本転写機構の 解析

(課題番号 12680673)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金基盤(C)
研究成果報告書

京 都 大 学 図 書



9810055109

附 属 図 書 館

平成14年3月

研究代表者

平 芳 一 法

(京都大学再生医科学研究所・講師)

研究組織

研究代表者：平芳 一法 （京都大学再生医科学研究所講師）

研究経費

平成 12 年度	2,200 千円
平成 13 年度	1,400 千円
計	3,600 千円

研究発表

（１）学会誌等

Expression of N-deacetylase/sulfotransferase and 3-O-sulfotransferase in rat alveolar type II cells.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(2):L292-301 2000

Li ZY, Kazunori Hirayoshi, Yazuhiro Suzuki.

（２）口頭発表

平芳 一法、小岸 久美子、John T. LIs :

転写初期過程への GAGA 因子の関与

日本分子生物学会、平成 12 年 12 月 13 日

法邑 賢一、平芳 一法 :

ショウジョウバエ TBP に対する RNA Aptamer を用いた基本転写機構の解析

日本分子生物学会、平成 13 年 12 月 11 日

転写には基本転写と制御転写がある。組織特異的な発現の様な制御を必要とする転写にはそれぞれの制御に必要な因子が必要になる。転写を活性化する因子の結合部位として注目されたのが、サルのパポバウウイルスの一種である SV40 初期遺伝子に存在するエンハンサーである。エンハンサーは”位置、方向性、距離に関係なく働く”。エンハンサーは通常 4-10bp の短い数種類のシスエレメントが集まってできている。

転写制御領域には何種類かのシスエレメントが存在し、それぞれのエレメントは一つ以上のトランス因子、すなわち転写制御因子によって、制御されている。転写制御因子には複数の基本的な機能があり、それぞれが蛋白質としてドメイン構造をとっている。DNA 結合部位、転写制御ドメインである。

遺伝子特異的な発現制御以外にすべての遺伝子に共通の発現制御機構、基本転写調節機構は、主に三段階に分けることができる。(図 1)

1. 初期転写複合体の形成：遺伝子は通常クロマチンと呼ばれる高度に折り畳まれた構造をとり安定した形で細胞内に維持されている。最近の研究から遺伝子特異的にクロマチンを解きほぐす因子が同定されてきている。また、従来からよく研究されてきた遺伝子特異的な転写調節因子の中にはクロマチン構造を壊し、遺伝子が転写できる状態にするものが含まれていることが明らかになってきている。TATA 結合領域を持つ遺伝子では、TATA 結合因子 TBP が遺伝子上をスキャンし、転写すべき遺伝子を検索する。TBP は TAF と呼ばれる因子と結合して TFIID というおおきな複合体を形成している。この複合体が TATA に結合することで転写に必要な基本転写因子群が結合する。(図 2)

2. プロモータークリアランス：初期転写複合体が転写を開始するため、遺伝子上を動き出すこと。詳細な機構の解析は未だなされていない。

3. 伸長反応：転写を司る酵素 RNA PolymeraseII が遺伝子上を動き、RNA を合成する。この過程には Ptefb のような、RNA PolymeraseII の C 末端をリン酸化する酵素の関与が知られている。

代表的な因子について下記に概説する

TBP 分子

多くの polII 系プロモーターは -30 付近に TATAAA のコンセンサス配列からなる TATA ボックスを有する。急激な誘導のかかる遺伝子、特異性のある遺伝子で強く発現するものは、たいていプロモーター内に TATA ボックスが存在する。TATA ボックスを除くと転写活性がほぼ完全に失われることから TATA ボックスは遺伝子制御の最重要シスエレメントと認められた。また TATA ボックスはその位置の移動に伴い転写開始部位も移動する事から転写開

始決定エレメントとも見なされている。この TATA ボックスに結合する因子として同定されたのが TBP (TATA binding protein) である。

TBP は多くの生物から得られている。これらを比較してみると C 末端側 180 個のアミノ酸には高い相同性がある。脊椎動物間では構造がほぼ完全に一致している。この部分は C 端保存領域 (C-terminal conserved region) と呼ばれる。これに対し、N 端側は共通性に乏しく N 端種特異的領域 (N-terminal specis-specific region) 或いは N 端可変領域 (N-terminal variable region) と呼ばれる。

TBP の機能を示す領域は全て C 末端側に存在。180 個のアミノ酸の中には緩い繰り返し配列が存在し、繰り返し配列の中には塩基性に富む部分が見られる。TBP 場合一般の転写制御因子とは異なり、ドメイン構造を取らない。DNA 結合領域の変異は転写能の消失も引き起こす。TBP は分子全体で機能を持つ。

TBP は鞍型 (saddle shape) をとる。TBP が TATA ボックスに結合する場合、鞍型構造の内側のくぼんでいる部分が DNA と接触する。TBP は DNA の minor groove にはまりこみ、DNA を曲げる。DNA は TBP によって約 80 度曲がる。このように曲がった TBP-DNA 複合体に TFIIA が結合する場合は鞍型構造の上流側の下方に、TFIIB が来る場合は、TFIIA の反対側の下方に結合する。TBP-TFIIA-TFIIB 複合体が DNA を取り包み、TFIIB の渦中側に polII の標的部位が形成される。(図 3)

N 端側の機能に関しては、高次構造の形成に何らかの影響を与えると考えられている。脊椎動物 TBP の N 端側にはグルタミン残基が連なる Q-run と呼ばれる領域が存在する。Q-run に対するモノクローナル抗体は TATA ボックスを有する polII と polIII プロモーターからの転写を阻害し、TATA-less プロモーターからの転写には影響を与えない。

TFIID、TAF

GAL4-VP16 や SpI による転写活性化が TFIID を用いた再構成系でみられるのに対し、TBP を用いた場合は転写の活性化がほとんど起こらなかった。転写制御には TFIID にある TBP 以外のものが必要があることがわかった。抗 TBP 抗体でショウジョウバエの TFIID 画分を免疫沈降すると TBP 以外に 20-250kD の範囲で 10 個程度の蛋白質が共沈降してきた。これが TAF (TBP-associated protein)。

TAF の機能として初期に注目されたのが転写のコアクチベーターとしての機能。SP1 による転写活性化には TAF110 が必要なことがわかった。TAF110 は TAF250 以外に Sp1 と結合する事がわかった。in vitro の再構成系で TBP、TAF110、TAF250、Sp1 と限定された基本転写因子で転写が観察された。TAF40 など活性化ドメインに多くの酸性アミノ酸を持つ酸性アクチベーターと結合す

る事が見いだされた。(図4)

TAFの多くは生育に必須であることが酵母を用いた解析に余地明らかになっている。hTAF250/yTAF145、ヒストン様構造を持つTAFなどである。hTAF250/yTAF145は細胞周期関連因子の転写やリボゾーム蛋白質の転写に関与し、細胞周期維持には重要であるが、ゲノム全体ではこのTAF依存的に起こる転写は17%程度である。一方ヒストン様TAFであるyTAF17は約72%の遺伝子の転写に影響し、その関与度が異なる。

TAFの中にはプロモーター認識能を持つものがある。hTAF150/dTAF150、dTAF62、dTAF42がTATAボックス、イニシエーター、下流エレメント(DPE)を認識する。TFIIDにプロモーター認識能があるということはTFIID複合体が均一なものでないことを想像させる。TFIIBを含むカラム画分の中に含まれるTBPとTAF170の複合体であるB-TFIID。標準的なTFIIDにはhTAF30を含むhTAFIID α とhTAFIID β がある。ホルモン受容体特異的TAF、B細胞特異的TAFも見つかっている。ショウジョウバエではTBP様因子TRF-1をTBPの代わりにもつTFIID(TRF-nTAF)があり、神経特異的転写や生殖細胞特異的遺伝子の発現に関与している。

TAFはTFIID以外つまり基本転写因子としての範疇をはずれる複合体の中にも見いだされている。すなわちSAGA(Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase),PCAF(p300/CBP-associated factor)などである。SAGAはHATを含む酵母の超高分子のメディエーター複合体である。PCAF(p300/CBP-associated factor)はp300/CBPに結合する因子でHAT活性を有する。ヒトから分離されたTBPを含まないTAFだけの複合体TFTC(TBP-free TAF-containing complex)も多くのTAFを有するが、3種類のヒストン様TAFを含む。

転写制御機構のうちプロモータークリアランスから伸長反応に至る過程に関しての研究があまり進んでいない。本研究ではポーズドポリメラーゼを解析対象として解析の対象とした。

ポーズドポリメラーゼ(paused polymerase)は、転写の進展反応中にその動きを停止したRNA polymerase IIのことである。いくつかの遺伝子(c-myc, c-fos, EGFレセプター, アデノシンデアミナーゼ, HSP70, HSP26, など)では、転写の伸長反応(elongation)を調節(停止)することにより、遺伝子発現を調節していることが知られている。これがpausingあるいは、transcription arrestと呼ばれる現象で、paused polymeraseを成立させる。発見当時は特定の遺伝子のみで起こると思われたが、多くの遺伝子で観察されるようになり、現在では一般的な現象として認識され、転写調節の重要な一過程と考えられている。

最初に paused Polymerase の存在が発見された、代表的な熱ショック(ストレス)蛋白質ショウジョウバエ HSP70 遺伝子では、転写開始点から、25-40 bp

転写が進行した所で、RNA polymerase が伸展反応を停止し、熱ショックによる急激な遺伝子の活性化がおこるまでその状態を維持している。この状態はいわゆる preinitiation complex が形成され、転写の伸展を待つばかりの状態に凍結したものである。すなわち、転写系が初期転写複合体を、我々研究者のためにわかりやすく開示してくれているのである。

ショウジョウバエ hsp70 遺伝子の転写は GAGA 因子の結合により遺伝子が転写可能な状態になる。基本転写因子群が転写調節領域に結合し、ポリメラーゼが転写を開始する。非ストレス条件下ではこの転写が 30~40bp 進んだところで伸展を停止する。熱などのストレスが細胞にかかると、転写因子である HSF が核内でその結合配列である HSE に結合し、伸展反応を再開させる。(図5)

Paused polymerase が観察される遺伝子でも、通常の転写開始反応と同様、open chromatin structure の形成および DNA melting の発生、TFIID、TFIIB 等のいわゆる general transcription factor を含む転写複合体の DNA への結合が起こり、転写が開始される。その後、転写複合体の構成成分と密接な関係を持った何らかの因子、或いはその構成成分の因子そのものによって、伸展反応が停止し RNA polymerase が paused polymerase の状態になるものと考えられる。

Paused polymerase の成立機構、解き放し機構を詳細に解析することで、プロモータークリアランスから伸長反応へ至る過程を明らかにすることができる。下な材までの知見を図6にまとめた。ショウジョウバエ hsp70 遺伝子の場合、GAGA 因子によって開いたクロマチン構造に基本転写因子が結合し転写開始可能な状態になる。この状態から実際の伸展反応に至るためには、熱などのストレスがシグナルとして核内に伝わり、P-TEFb などによるポリメラーゼ C 末端のリン酸化が起こって伸展反応が進行する。

今までの転写研究の多くは *in vitro* で各因子を解析する、あるいは酵母を用いた研究が主であった。しかし、実際の反応は生体で起こっており、詳細な解析は *in vivo* で行われてこそ真の解析になる。*in vivo* での解析法として anti-sense DNA の導入、抗体の顕微注入法、RNAi による方法があるが、すでに存在するタンパク質に対して効率よくその機能そのものを阻害する方法がなかった。酵母は *in vivo* での解析を遺伝学的な方法で可能にするが、ポーズドポリメラーゼは観察されず、高等真核生物とは少し異なる。

RNA aptamer は、RNA 分子の持つ高次構造を利用することでタンパク質等の生体内物質と結合する。この分子を利用し、この分子の結合した因子の影響を調べることで、ポーズドポリメラーゼの成立、解き放し機構を生体内で解析し、ひいては、転写制御機構特に伸長過程に至る過程を詳細に解析する。

RNA aptamer の選択

RNA aptamer は SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) と呼ばれる *in vitro* 選択法によって選択される。SELEX は人工的に合成した、全くランダムな DNA プールから RNA を作成し、ある特定の物質 (蛋白質、糖など) に対して、結合能を有する RNA を特異的に選択する方法。図に示すように、ランダムな DNA プールの 5' 末端には、RNA の合成に必要なプロモーターが付加され、*in vitro* での RNA 合成が可能である。合成した RNA はメンブレン或いは、カラム上で特定の物質に対して結合能のあるものがスクリーニングされる。こうして選択された RNA は逆転写酵素によって DNA に読み替えられ、増幅される。増幅された DNA から RNA を合成し、結合能のある分子が選択される。このサイクルを繰り返すことにより、ある物質に対して結合能を有する単一の RNA 分子が選択される。こうして選択された RNA 分子をアプタマーと呼ぶ。(図 7)

アプタマー (Aptamer) は、MGH の Szostak によって命名された、*in vitro* 選択法によって選択された、機能を持つ RNA 分子の総称である。ラテン語の *aptus* (英語の *apt, fit* に相当) という言葉を基に命名されたこの分子は、その言葉の示すとおり、ある物質に対してぴったりと合う RNA 分子の事である。アプタマーは、RNA の核酸としての一次構造ではなく、その分子に特徴的な高次構造によって、特定の物質に対して結合する。結合したアプタマーは、ある物質に対して、抗体や酵素のように種々の機能を発揮する。特性として、i) 抗体のように、ある蛋白質特異的に作用し、ii) 低分子物質のように細胞中で迅速に標的とする特異的蛋白質に結合でき、かつ、iii) 全器官中でその効果を期待できる。また、プラスミドの形で生体内に導入する事が可能であり、その発現が、転写調節機構により調節が可能であり、転写調節機構を使いこなすことにより、ある特定の時期にある組織、器官で発現が可能である事などが上げられる。その機能を生かすことで、従来用いられてきた抗体、アンチセンス RNA の代わりとして基礎研究領域での応用、或いは医薬品として、広範な領域での活用が期待される分子である。

本研究では、初期転写複合体の成立に関与する基本転写因子の中で、*paused polymerase* の成立に最も関与すると考えられる TBP (TATA binding protein) の機能を阻害する aptamer の選択を行った。選択過程には図 8 に示すような種々の条件を用いた。これは初期の選択過程ではより多くの分子を取得し、サイクルを重ねるに従って結合能の高い分子のみを取得使用とするためである。選択したアプタマーの配列を比較してみると、共通の配列を含むものは一組のみだった。(図 9)

この結果は、分子の多様性を示す反面、分子自体が確かに TBP と結合し得るものか不明である。共通の配列が存在市内場合でも構造として類似する可能性がある。そこで、構造に関して二次構造予測ソフトを用いて解析した。(図 10) 図に示したのは一例であるが、ステムループ構造をいくつかの場所とする。これは構造を予測する際に入力する条件によってことなり、結論として構造の予測から分子の類似性を想定することはできなかった。

表面プラズモン共鳴による aptamer の解析

選択した RNA aptamer がどれくらいの力で TBP と結合しているかを知るにはやはり解離定数を算定するしかなかった。従来はゲルシフト解析によって算出するのが一般的な方法出会ったが、それでは大量の分子を効率よく算定することができない。そこで、表面プラズモン共鳴を用いて解析する事にした。この方法を応用した測定機器として Biacore がある。Biacore を用いて解析を開始した。図 11 に SPR による測定の原理を示した。aptamer は超薄金膜表面に固定したタンパク質に対して液中で結合反応を起こす。この条件は非常に早い onoff の繰り返しで、比較的生理条件に近いと考えられる。

具体的なデータを図 12 に示す。4 つの青色の線は aptamer を段階的に希釈した濃度に呼応している。濃度の上昇に伴い、結合能を示す Angle 値の上昇が認められる。この値を基に解析すると、この aptamer が特異的な結合をしていることが数値の上からも明らかになった。この方法を用いて各 aptamer を解析した。

具体的な結果を図 13 に示した。B52 は報告者がかつて在籍していた米国 Cornell 大学の John Lis 教授の研究室で同定されたスプライシングに関連したタンパク質で S552 はこのタンパク質に対して特異的に結合する事が確かめられている aptamer である。つまり正のコントロールである。この aptamer の解離定数を基準に今回選択した TBP に対する aptamer の解離定数を比較すると、多くのものは同程度の範囲にあり、特異的な結合をしているものと考えられる。

表面プラズモン共鳴を利用した aptamer の選択

SELEX において通常の方法であるフィルターあるいは樹脂を用いた選択方法では、それら基質に対して aptamer が非特異的な結合を示す。この問題は固相を用いた場合にはよく経験することである。この問題を取り除くため液相を用いる SPR の応用を思いついた。図 14 にその原理を示した。金膜表面に固定されたタンパク質に結合した aptamer を液相のまま回収する事ができる。ま

た同時に結合能の高さをモニターすることができるのである一定以上の強さを持って結合している aptamer のみを回収することが可能である。

この方法では TBP のような DNA 結合タンパク質に対してスクリーニングを行う時に DNA に結合した活性型の状態のタンパク質に結合可能な aptamer を選択的に回収することが可能である。

選択過程の途中のサイクルに当たる種々の aptamer が混在する状態での SPR による測定値を図 15 に示した。

beads は樹脂で選択したプール、Biacore は SPR で選択したプールを示す。いずれの場合もサイクルがあがるに従って、解離定数が上昇していくことがわかる。SPR の場合には、サイクル 9 でほぼ飽和した状態になっており、従来の方法よりもより効率よく選択されていることを示唆しているものと思われる。

図 16、17 にそれぞれ樹脂と SPR を用いて選択した aptamer の配列を示す。両者で特徴的な配列は認められなかった。選択した各 aptamer の結合能を図 18 に示す。大体 10^8 程度の値が得られた。

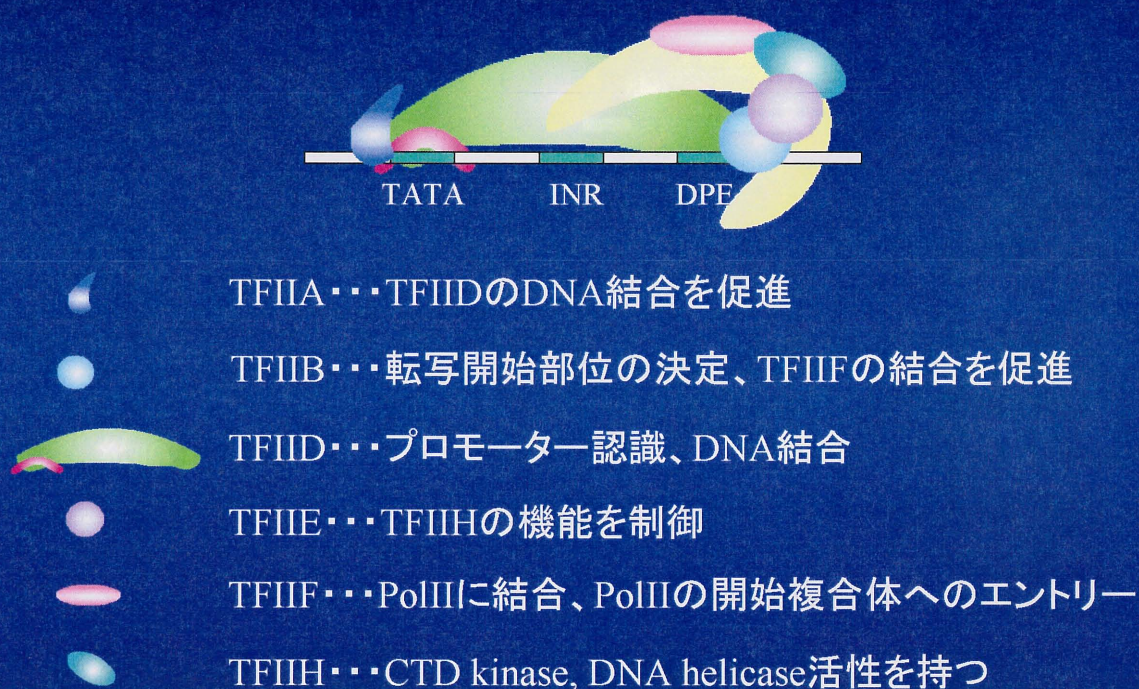
結語

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) によって選択される機能 RNA 分子、RNA aptamer の特徴を生かした研究方法を構築し、初期転写複合体の成立機構の解析を進めてきた。選別に成功した、TBP (TATA binding protein) に対する aptamer の結合様式を、表面プラズモン共鳴を用いた方法で解析し、選択したそれぞれの aptamer が結合定数は 10^7 から 10^8 程度を示し、特異的に結合していることが明らかになった。本文中に具体的なデータを示さなかったが、転写に与える影響について、*in vitro* での解析を行った。*in vitro* transcription の系に、選択した aptamer を添加し、転写物を解析した。非常に興味深いことに、aptamer は転写を促進するものと転写を抑制し、短い転写物を蓄積するものの二種類に大別された。TBP に対する aptamer がこのような作用を示すことから、転写複合体中で TBP を核とした因子の組み合わせにより、転写が調節されていると考えられる。TBP に対する aptamer の効果は、転写複合体のなかで、TBP に結合しているある因子の結合を阻害あるいは強固にしたために生じたものと類推される。TBP の aptamer 結合部位を解析する事により、転写複合体中での因子の結合状態、全体の位置関係を知ることができる。現在、aptamer の構造を RNase によるマッピングにより決定し、個々の aptamer について結合部位を同定している。今後、aptamer を細胞内に導入する事で *in vivo* での解析を進めると共に、*in vitro* で詳細な解析をおこなうことにより、転写複合体中の各因子の相互関係について明らかにしていく予定である。

もう一つの研究目標であった TAF60 に関しては、未だ解析途中で具体的なデータを示すことができなかった。しかし、TBP の結果を参考にこれから飛躍的に進むものと期待している。

TBP が結合する TATA と TAF60 が結合する DPE はポーズドポリメラーゼの私立には不可欠の配列である。両者に特異的な aptamer が選択されて初めて真の意味での解析がなされる。最終目標であるポーズドポリメラーゼをモデルシステムとした、初期転写機構特に転写開始から伸長反応への移行機構の解明を進めていく予定である。

基本転写因子の機能と転写開始複合体の形成



転写を開始する

図1

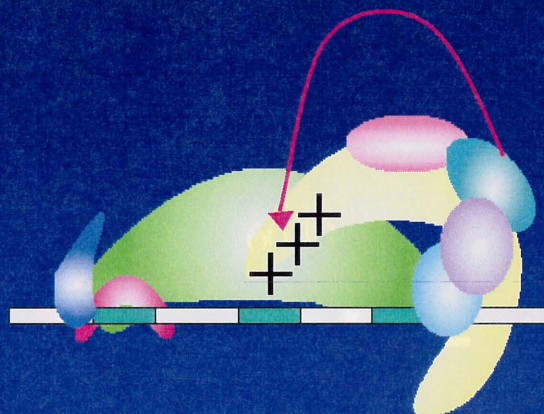
転写開始複合体における現在の知見をまとめた。遺伝子の転写調節領域に存在するTATA、DPE領域にTBPを核とするTFIID複合体が結合し、その他の基本転写因子TFIIA、TFIIB、TFIIIE、TFIIF、TFIIHが結合する。TFIIFはRNA PolymeraseIIと結合した状態でこの複合体の中に組み入れられ、転写開始複合体が完成する。

図2

転写の過程を順を追って示した。本文中に示したように開始複合体が形成された後、プロモータークリアランスが起こり転写進展反応へと移行し始める。本格的な伸長反応はP-TEFbのようなRNA Polymerase IIのCTD領域をリン酸化する因子が関与することによって進む。

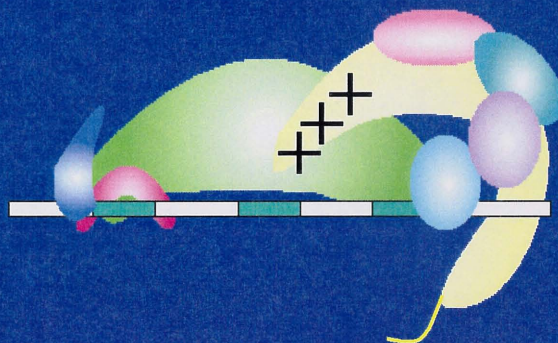
開始複合体の形成

TFIIHのKinase活性により
CTDがリン酸化される



プロモータークリアランス

RNAPIIがプロモーターから離れ、
約10ntほどのRNAが合成



伸長反応

TFIIEと結合し本格的に
転写を開始する

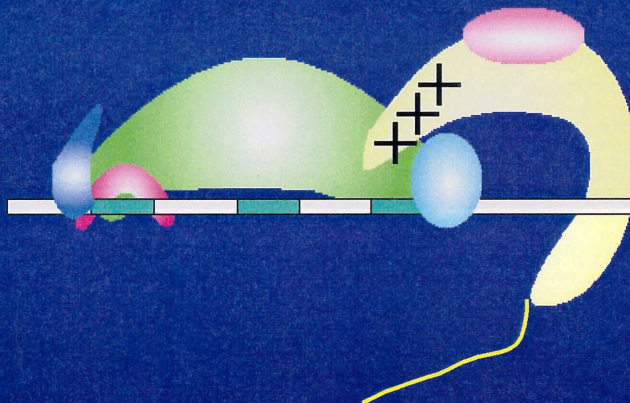


図2

転写の過程を順を追って示した。本文中に示したように開始複合体が形成された後、プロモータークリアランスが起こり転写進展反応へと移行し始める。本格的な伸長反応はP-TEFbのようなRNA Polymerase IIのCTD領域をリン酸化する因子が関与するいことによって進む。

プロモーター付近における予想される TAF-DNA複合体の構造

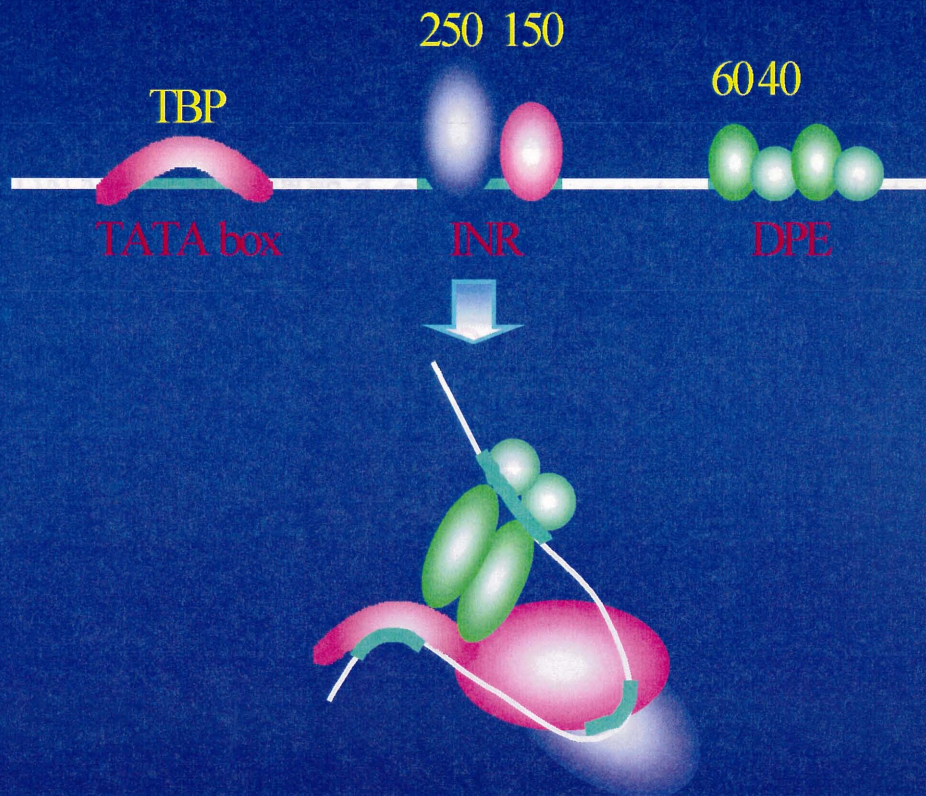


図3

転写制御領域において報告されているTAFの結合領域を示した。TAF自身で転写制御領域に存在する転写開始点+30bp付近に存在するDPE(Down promoter element)に結合するTAFの存在が知られている。

TBP-Associated Factorとは？

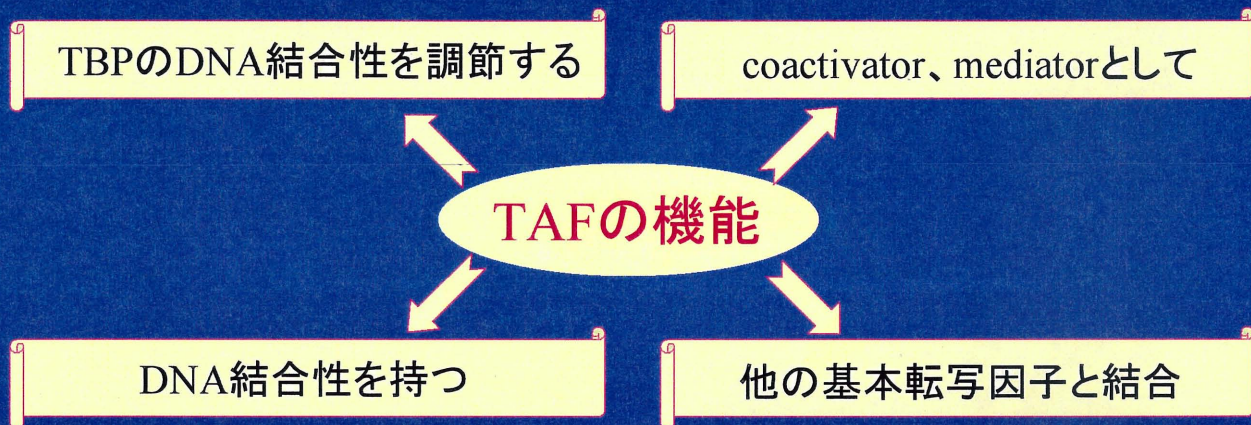


図4

TAF(TBP Associated Factor)はその名の示すように、TBPに結合するだけでなく、複数の機能を有する。それ自身のDNAへの結合能は転写制御領域におけるDPE領域への結合を示唆するものである。

Hsp70遺伝子の転写の実際



図5

ポーズドポリメラーゼを有するショウジョウバエhsp70遺伝子の転写の概説

転写制御領域に存在するGAGA配列にGAGA Factorが結合してクロマチン構造を解きほぐし、遺伝子が転写可能な状態にする。非ストレス下では転写複合体が転写開始後約40bpのところでその進展を停止し、ストレスによるシグナルを待って待機している。ストレスによるシグナルはHSF(Heat Shock Factor)によって細胞内に伝えられ、HSFの結合領域であるHSEに結合することによって、待機していた転写複合体が再びその進展を再開する。

これまでの知見

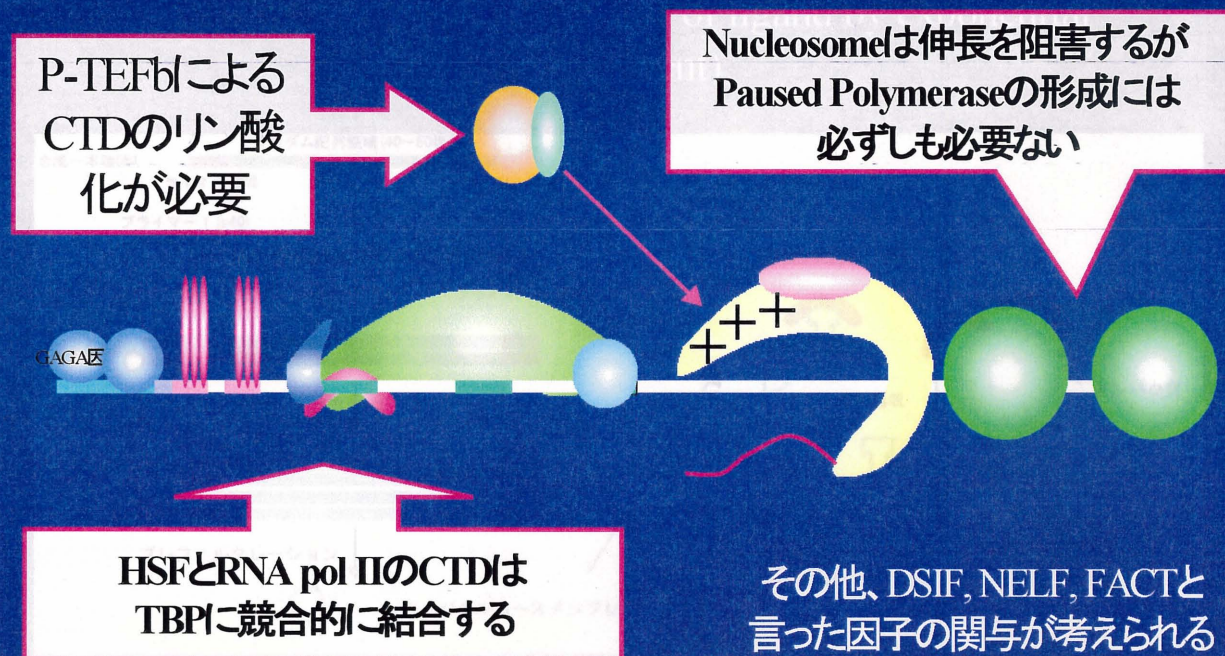


図6

ポーズドポリメラーゼの成立と解き放しに関連すると思われる因子群

ポーズドポリメラーゼの成立にはGAGA因子が必須。これはクロマチン構造を解きほぐし、遺伝子を読める状態にするため。伸展の再開に関してはP-TEFbの関与が必要。しかし成立そのものに関与する因子群は未だ同定されていない。

RNA aptamerの選別方法 (SELEX; Systematic evolution of ligand by exponential enrichment)

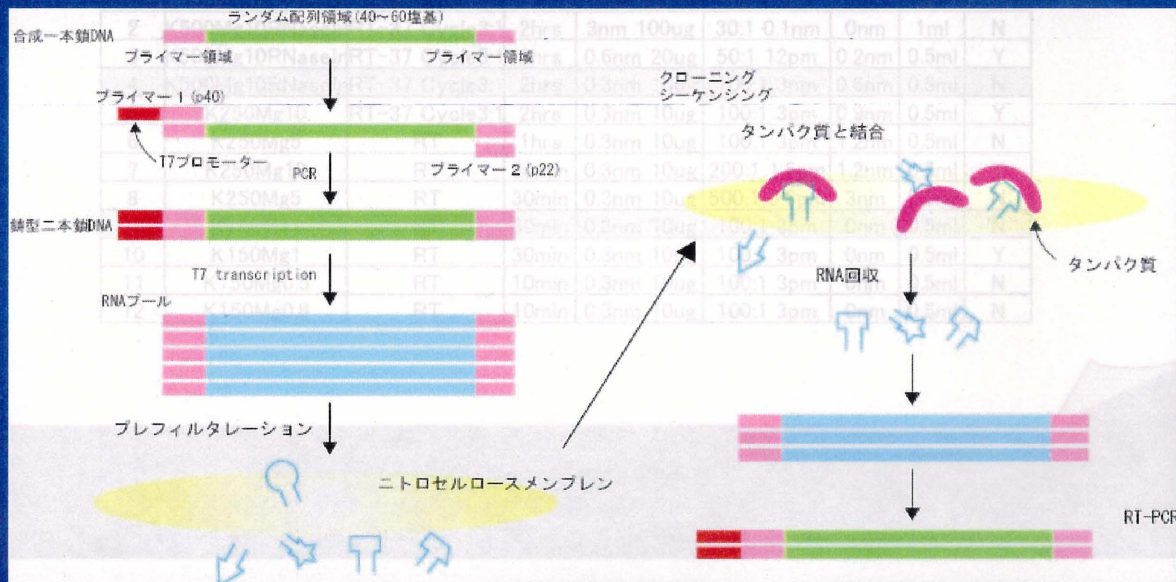


図7 RNA aptamerの選別に用いた反応条件

SELEXによるRNA aptamer選択の実際

本文中に述べたように完全にランダムな配列で合成されたオリゴヌクレオチドライブラリーを基にRNAを合成する際に必要な配列を含むプライマーを用いて増幅し、合成したRNAを目的とするタンパク質と結合させ結合したものを回収する。このサイクルを繰り返すことで目的とするタンパク質に真に結合するRNAを選択する。

TBPに結合するRNA aptamerの選別

Cycle	Buffer	Temp.	Time	RNA	R/P & P	nsC	Vol.	Pre-S
1	K500Mg10RNaseI	RT-37 Cycle3:1	2hrs	20nm 700ug	20:1 1nm	0nm	4ml	N
2	K500Mg10RNaseI	RT-37 Cycle3:1	2hrs	3nm 100ug	30:1 0.1nm	0nm	1ml	N
3	K500Mg10RNaseI	RT-37 Cycle3:1	2hrs	0.6nm 20ug	50:1 12pm	0.2nm	0.5ml	Y
4	K500Mg10RNaseI	RT-37 Cycle3:1	2hrs	0.3nm 10ug	100:1 3pm	0.6nm	0.5ml	N
5	K250Mg10	RT-37 Cycle3:1	2hrs	0.3nm 10ug	100:1 3pm	0.9nm	0.5ml	Y
6	K250Mg5	RT	1hrs	0.3nm 10ug	100:1 3pm	1.2nm	0.5ml	N
7	K250Mg10	RT	30min	0.3nm 10ug	200:1 1.5pm	1.2nm	0.5ml	Y
8	K250Mg5	RT	30min	0.3nm 10ug	500:1 0.6pm	3nm	0.5ml	N
9	K150Mg1	RT	30min	0.3nm 10ug	100:1 3pm	0nm	0.5ml	N
10	K150Mg1	RT	30min	0.3nm 10ug	100:1 3pm	0nm	0.5ml	Y
11	K150Mg0.5	RT	10min	0.3nm 10ug	100:1 3pm	0nm	0.5ml	N
12	K150Mg0.6	RT	10min	0.3nm 10ug	100:1 3pm	0nm	0.5ml	N

図8

RNA aptamerの選別に用いた反応条件

Bufferはバッファー条件

TempはPCRの条件

RNAはRNAの濃度と存在量

R/P&PはRNAとタンパク質の量比とタンパク質の総量

nsCは非特異的な競合物の濃度

Volは反応量

を示す。

Templateの塩基配列

No.	塩基配列	AT(%)	GC(%)
TBP1	aacgaagtgttaagggaaccacacgggtcagccaaggc	42	58
TBP2	catggtggcaacctaaagcgggcagcgtcggcctcgac	33	67
TBP3	cgaacgcacctgtattctgatcctacgtactcggccga	39	61
TBP4	actgccacgggacgtttgccctgagcgtacaccggaccc	34	66
TBP5	ggagcacgggaagaacgtccgcggtgtgacatgatagcagtcctcaat	44	56
TBP6	aaaacactgagacgaagtgttaagggaaccacacgggtcagccaaggc	46	54
TBP7	gcacttcggactcactggaccggtttcacctactgccccg	38	62
TBP8	caccaaccaacaagacaagaggcagaggatacagaccaagaagccgcaacc	47	53
TBP9	ccaaaaaccagaagatgctgacagcgtcgcgcttaaacaccaccgagt	46	54
TBP10	gtatgcacctcacgaagcggacgcaatagaatagaccggcctcccgaaccca	42	58
TBP11	cacgccaccacccctcctaccatcgcccccggtggccc	26	74
TBP12	ggctgttcgagtacgtccatcccccttctgaacaacctcc	43	57
TBP13	tgacatacaagtgagctgacgtaaggtgcgcgagccccaacaacaagcca	45	55
TBP14	caagatccacacacacgtggctatgaaggtacaagcccc	47	53
TBP15	ggaacttgtaaacgcaagacctgagataagttgttagcaagtggtgtgt	54	46
TBP16	acatccgtccctgacacaatacataca	51	49

図10

図9 合するRNA aptamerの二次構造を予測ソフトを使用して表した。ステムループ構造をとり、TBPに対して結合能を示したRNAの塩基配列

共通する塩基配列を含むものが一組のみ存在したが、ランダムな配列が結合していることがわかる。これらの配列に対して結合の強度を検定する必要がある。」

TBPG13-6の予想立体構造

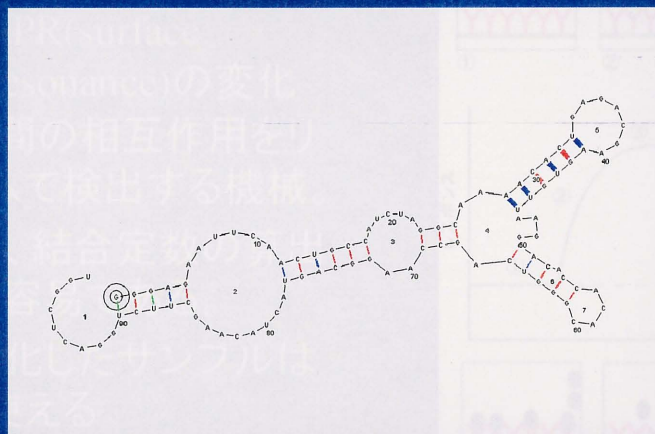


図10

TBPに結合するRNA aptamerの二次構造を予測ソフトを使用して表した。ステムループ構造をとり、立体構造をとることが想定される。

Biacoreの原理

- ・ センサーチップ上の質量変化に伴うSPR(surface plasmon resonance)の変化から因子間の相互作用をリアルタイムで検出する機械。
- ・ 解離定数、結合定数の算出が非常に容易である。
- ・ 一度固定化したサンプルは繰り返し使える。

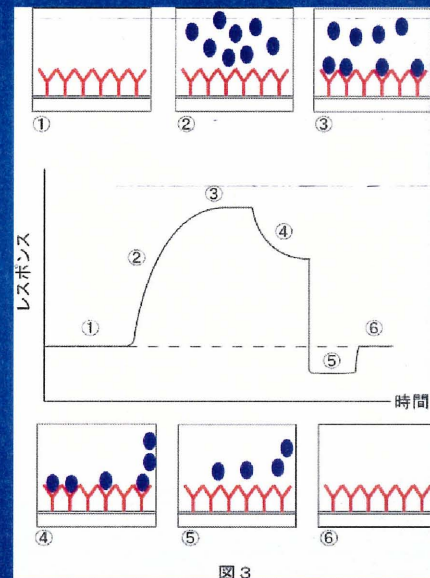


図11

SPR (Surface plasmon resonance)を応用した測定器Biacoreの測定原理

1. は測定する際の基板となるチップを示す。超薄の金膜表面にデキストランがコートされておりそこに目的とするタンパク質を結合させる

2～4. RNA aptamerを流し、タンパク質に結合している様子を閉めず。レスポンスの上昇がみられるが非特異的に結合しているものがその後の洗浄(4)ではずれ真に結合するものが残る。

5. 乖離剤で洗浄し初期の状態6に戻る。

各RNA aptamerの結合の解析

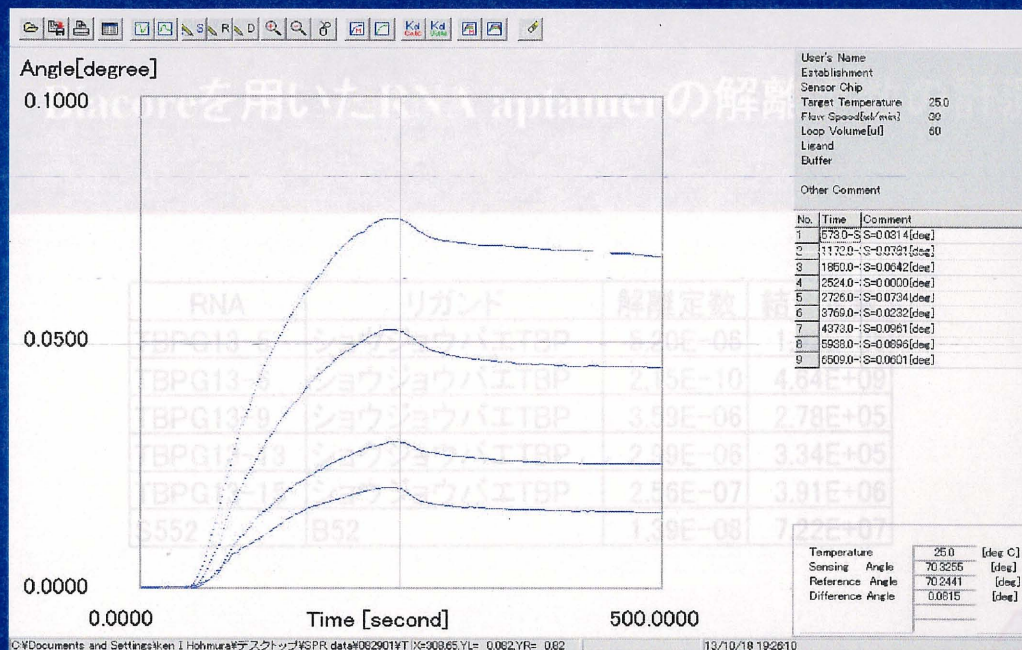


図12

SPRによる解析の例

濃度の上昇に応じて結合量の上昇が観察され、特異的な結合をしていることがわかる。

図13

Biacoreを用いた解離定数の測定結果

抗体には及ばないものの、特定のタンパク質に対してかなり高い結合能を示す。

Biacoreを用いたRNA aptamerの解離定数の計測

RNA	リガンド	解離定数	結合定数
TBPG13-5	ショウジョウバエTBP	5.20E-06	1.92E+05
TBPG13-6	ショウジョウバエTBP	2.15E-10	4.64E+09
TBPG13-9	ショウジョウバエTBP	3.59E-06	2.78E+05
TBPG13-13	ショウジョウバエTBP	2.99E-06	3.34E+05
TBPG13-15	ショウジョウバエTBP	2.56E-07	3.91E+06
S552	B52	1.39E-08	7.22E+07

図13

Biacoreを用いた解離定数の測定結果

抗体には及ばないものの、特定のタンパク質に対してかなり高い結合能を示す。

RNA selectionへのBiacoreの応用

実際に用いた実験系

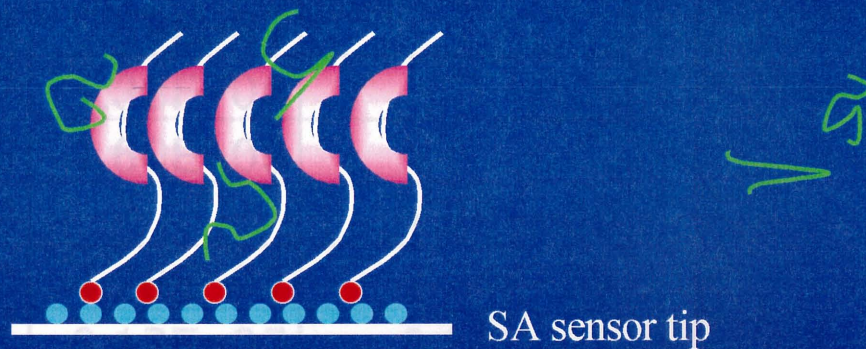


図14

Biacoreを用いたSELEXの応用

ペーパー、樹脂を用いた時に見られる非特異的な結合を抑えるため、SPRを用いた選別方法を導入した。この方法では、液中で反応がすすみ、その結合がそのまま数値としてみることができるので、非特異的な結合を抑え結合能の高いaptamerを選別することができる。

各サイクルにおけるRNA poolの解離定数

		(単位はM)
cycle	beads	Biacore
6	5.89E-07	
7	1.38E-08	
8	1.60E-09	
9		1.89E-09
10	4.28E-07	2.24E-09
11	6.17E-07	9.85E-08
12	1.54E-08	8.75E-11

図15

各サイクルのプールをそのままSPRで解析した。サイクルが進むに従って解離定数が上昇し集団として結合能の高いものが蓄積している様子がわかる。

Beadsを用いて選択したRNA aptamerの塩基配列

TAG13DN-1	Beads	TACGCACTTCAAG CGCCCT GTTGTGCAGTCCCGATGTCC
TAG13DN-3	Beads	TGCACGAGTCCACAGAACCTCC TACCCC CACCCTGTAGGCGC
TAG13DN-6	Beads	GCATTACAT CGGC GACAA GCCG TGG TATACCCC GCTGCCC
TAG13DN-7	Beads	ATCCGCCAACCAGCTCAGCGATCCAGCCAG CCGAG GCCTCG
TAG13DN-8	Beads	ACGGTACCAGACACTG AGCCCTCGC GACGCTTAACCGCGCGG
TAG13DN-9	Beads	TCTGCCTCACTGCACCGCTGCACGGCTTAGCACCACCTG
TAG13DN-10	Beads	CAGCCATAAC GCCCGTATAC CCAGCCGGTGCCTCACC
TAG13DN-11	Beads	AATAGTCCCGACTGCTTGGCGTACCACGAATGTCCTGGCAG
TAG13DN-13	Beads	CATTCTTAAG GCCCG AAACTATGCCTCGCAGCGCAAGCAAC
TAG13DN-14	Beads	GCGT GCCGCG GATGGTTACCGCGCCTACACCTCGCT
TAG13DN-15	Beads	GACCCTACCTCGGTATACCGCTCCGCATTAAACCCGCCCGG
TAG13DN-16	Beads	ACCCGAGTACCTACCGGCCTCGGAACCCCGGACCGACCCG
TAG13DN-17	Beads	GCTCCAGACGCAATCCCTGACACTTGCCACCCG
TAG13DN-18	Beads	CACCGCGTTGCAGTGAGCGGCTTGAGGTCCGCCCGAGCGCAGA
TAG13DN-19	Beads	ACTACAAGCTGTGCGCGAAGGGACCAACTGCCCGA
TAG13DN-20	Beads	CCACCCGTCCCTGACGCGGCCCGCGCGCACCAAGCCGCTCC

図16

従来の方法で選択したaptamerの配列

一部で共通するような配列がみられるが全体としてはコンセンサスシーケンスのようなものは見あたらない

Biacoreにより選択したRNA aptamerの塩基配列

TAG13DN-1	Biacore	GCACGACGTCCACTGCTAAAATGTGAAAACCGGCTTGGCC	0.974
TAG13DN-2	Biacore	ACCGACCCAGCGTGTCTGCGCCGCGACTATGCCTATGCGT	0.972
TAG13DN-3	Biacore	TGTCTCGTGGCTTGGTCATAGCCCCCTTGGACGCCGTATCC	0.941
TAG13DN-4	Biacore	AGACCGCTAGCCTCACTGGCCGCGAGTACTCAAAGCTGCAG	0.971
TAG13DN-5	Biacore	TCCGAGCATCCATAGCGTAAGCCAAACGCTGGACGAGCCTA	0.938
TAG13DN-6	Biacore	TTACGCGCGGGCCCTCGCTCCAGCGCTCGCTCC	0.928
TAG13DN-7	Biacore	GACGACCCGCGATGATACGCACTACCACATCCTTTGTGAT	0.923
TAG13DN-8	Biacore	AATCGGCCAGCAGCCTTAGCCACTTACGTACGCGAGACGCT	0.923
TAG13DN-9	Biacore	AGCCGCAATTCACGAATCCTCTTAATGGTCCCAGTCCGT	0.923
TAG13DN-10	Biacore	TGCCCGTTTCCACCGGGTTGTCTGTACCGGCTTACTCAGGCA	0.923
TAG13DN-11	Biacore	AAGAACTGGAGAACGAAGCCCTAACGGGTGGCTTCCTAACTCCGGATTCCGAA	0.923
TAG13DN-14	Biacore	CTACTTCCTGGTAGTGAGGTCATCAAGAGGCGCGCGTCC	0.923
TAG13DN-15	Biacore	CCCATTCCGCCGCGCAGCACGTTGGGTGGCAGTCCAAC	0.923
TAG13DN-16	Biacore	TGGGTAACCGCCATTACGACCCGAGCGGTACCCCGAGCCA	0.923
TAG13DN-17	Biacore	TGAACCGAGCGTTTCCATATCTTGCTTACGCACTACCTTC	0.923
TAG13DN-18	Biacore	AAACGAGACCAGTGGCCAACTGCGCACGCC	0.923
TAG13DN-19	Biacore	GTACCGAGCCAGCGGGTCGCCGCGGTAGTCACCCCGCCA	0.923
TAG13DN-20	Biacore	GCTCGCTCCGGGTTTTACCCCTGAGCCTG	0.923

図17

Biacoreにより選択したaptamerの配列

この場合も、一部で共通するような配列はみられるが全体として、コンセンサスシーケンスのようなものは見あたらない

SPRを用いたRNA aptamerのTBPに対するaffinityの解析

		KD(M)	Affinity(1/M)	Kass(1/Msec)	Kdiss(1/sec)	回帰直線の相関
TAG13DN-1	Beads	1.47E-08	6.80E+07	1.18E+05	1.74E-03	0.969
TAG13DN-3	Beads	2.04E-08	4.89E+07	1.68E+05	3.43E-03	0.969
TAG13DN-6	Beads	7.64E-09	1.31E+06	1.15E+06	8.80E-03	0.94
TAG13DN-7	Beads	1.18E+08	8.46E+07	1.44E+05	1.70E-03	0.974
TAG13DN-8	Beads	8.75E-10	1.14E+09	2.51E+06	2.19E-03	0.676
TAG13DN-9	Beads	1.06E-08	9.45E+07	2.14E+05	2.26E-03	0.941
TAG13DN-10	Beads	1.90E-08	5.26E+07	2.51E+05	4.76E-03	0.97
TAG13DN-11	Beads	2.32E-08	4.32E+07	5.22E+05	1.21E-02	0.936
TAG13DN-13	Beads	2.54E-08	3.93E+07	1.40E+05	3.56E-03	0.928
TAG13DN-14	Beads	1.45E-08	6.89E+07	2.13E+05	3.10E-03	0.944
TAG13DN-15	Beads	2.17E-08	4.61E+07	4.29E+05	9.31E-03	0.957
TAG13DN-16	Beads	1.79E-08	5.60E+07	2.04E+05	3.65E-03	0.983
TAG13DN-17	Beads	1.68E-08	5.95E+07	1.96E+05	3.29E-03	0.987
TAG13DN-18	Beads	2.23E-08	4.48E+07	1.11E+05	2.47E-03	0.973
TAG13DN-19	Beads	5.01E-08	2.00E+07	6.08E+04	3.05E-03	0.948
TAG13DN-20	Beads	2.16E-07	4.65E+06	2.17E+04	4.67E-03	0.868
TAG13DN-21	Beads	5.55E-09	1.80E+08	7.93E+05	4.40E-03	0.873
TAG13DN-23	Beads	1.10E-08	9.12E+07	1.16E+06	1.27E-02	0.97
TAG13DN-24	Beads	8.26E-09	1.21E+08	1.24E+06	1.02E-02	0.975
TAG13DN-25	Beads	1.50E-08	6.66E+07	1.14E+06	1.71E-02	0.928

図18

SPRを用いた各aptamerの結合能の解析

解離定数が 10^{-8} 程度の比較的結合能の高いものが取得できた。